

IMMUNE SENSOR AND IMMUNE DETECTION

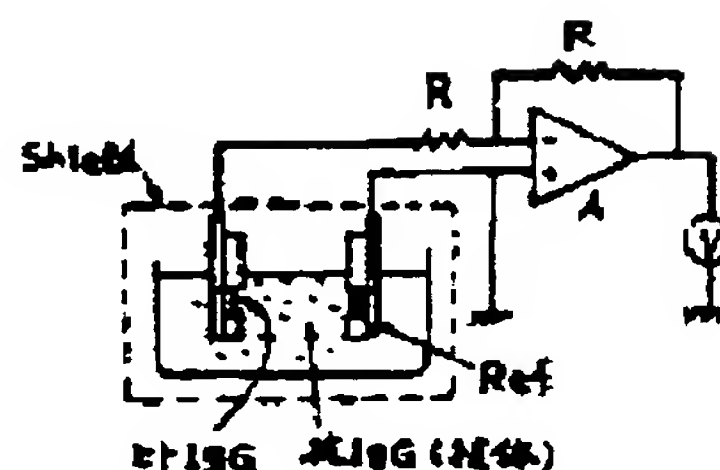
Patent number: JP63208753
Publication date: 1988-08-30
Inventor: KATSUBE TERUAKI; KAWAGUCHI TAKEYUKI; JO HISASHI
Applicant: TEIJIN LTD
Classification:
- international: G01N27/30; G01N33/543
- european:
Application number: JP19870040438 19870225
Priority number(s): JP19870040438 19870225

Report a data error here

Abstract of JP63208753

PURPOSE: To permit selective detection of the dilute antigen material and antibody in an aq. soln. with high sensitivity by using an iridium oxide electrode covered with the antibody or antigen material as a working electrode and detecting the potential difference between said electrode and reference electrode.

CONSTITUTION: Two sheets of electrodes are formed by immobilizing human IgG together with a monomolecular film of stearic acid by using a Langmuir- Blogett's technique on an electrode formed of the thin iridium oxide film formed to 500-1,000 Angstrom film thickness by a sputtering method on a glass substrate, by which two sheets of electrodes are formed. The antigen of the one electrode is deactivated by projection of UV rays to form the reference electrode Ref. The aq. anti-human IgG antibody soln. is dropped to a phosphoric acid buffer soln. into which the working electrode of the non-deactivated antigen is immersed together with the reference electrode Ref. The potential generated on the surface of the IgG immobilized film is then measured by an amplifier A.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-208753

⑮ Int. Cl.

G 01 N 27/30
33/543

識別記号

庁内整理番号

L-7363-2G
Z-7906-2G

⑬ 公開 昭和63年(1988)8月30日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全5頁)

⑭ 発明の名称 免疫センサ及び免疫検出方法

⑰ 特 願 昭62-40438

⑱ 出 願 昭62(1987)2月25日

⑲ 発 明 者 勝 部 昭 明 埼玉県浦和市下大久保255 埼玉大学工学部内
⑲ 発 明 者 川 口 武 行 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社中央研
究所内
⑲ 発 明 者 城 尚 志 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社中央研
究所内
⑳ 出 願 人 帝 人 株 式 会 社 大阪府大阪市東区南本町1丁目11番地
㉑ 代 理 人 弁 理 士 前 田 純 博

明 細 書

1. 発明の名称

免疫センサ及び免疫検出方法

2. 特許請求の範囲

1. 抗体又は抗原物質の薄膜を被覆した酸化イリジウム電極を作用電極とする免疫センサ。
2. 当該作用電極と参照電極との間の電位差を増幅して、電圧、電流又は電荷量として検出する手段を有する特許請求の範囲第1項記載の免疫センサ。
3. 当該参照電極が、当該作用電極の抗体又は抗原物質を不活性化したものである特許請求の範囲第2項記載の免疫センサ。
4. 当該作用電極が、MOSFET上のゲート領域に設けられている特許請求の範囲第1項～第3項記載のいずれかの免疫センサ。
5. 当該作用電極が、MOSFETのゲート領域以外に、導電性配線を介して分離して設けられている特許請求の範囲第4項記載の免疫

センサ。

6. 抗体または抗原物質の薄膜を被覆した酸化イリジウム電極からなる作用電極と参照電極とを、抗原物質または抗体を含む溶液と接触させ、当該作用電極上での抗原-抗体反応に伴う電位変化を、電位変化、電流変化又は電荷量変化として読みとる免疫検出方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は新規な免疫センサ、及び希薄濃度の抗原又は抗体を短時間で検出できる免疫検出方法に関する。

近年、各種の微量な化学物質を検出するセンサとして、電界効果型トランジスタ(Field Effect Transistor、以下、FETと略す)を利用した化学センサ、例えば、イオン選択性FETや酵素FET等が研究されている。これらのセンサは、従来のガラスPH電極等比べて高感度、高応答性に優れ、高インピーダンスであるほか、IC製造技術利用により量産性、超小型化などの点でも有利である。

一般に、FETセンサは基板、バリヤー膜及び感応膜から形成される。基板MOSFETでゲート金属を取り去った構造(以下、MOSFET基板と略す)が代表的である。また、バリヤー膜は通常、酸化シリコン又は窒化シリコンが用いられる。更に、感応膜は目的に応じて、例えば、PHセンサの場合には酸化アルミニウムや酸化タンタル膜が一般的であり、酸素センサの場合にはグルコースオキシダーゼやウレアーゼ等が用いられている。これらのFETセンサは、応答速度や検出感度の点では一応満足できる特性を示すものもあるが、共通の問題点として、1)ゲート部の遮光効果が不十分な場合光に対して感応するという欠点や、2)ゲート部に遮光効果の有る通常の金属薄膜電極を設けた場合、種々の検体液中での該金属薄膜表面と溶液との界面電位が一定とならず、電極表面での抗原抗体反応に伴う微少な電位変化を検出できないという問題点、更に3)長時間使用時に信号のドリフトが見られるという欠点があった。こうした欠点は、特に自然光下での水溶液

中の希薄物質、例えば抗原や抗体タンパク等を検出する際に問題となり、高感度かつ安定な免疫FETセンサの実現を阻んでいた。

また、抗原や抗体の検出法としては、これまで酵素標識抗体を用いるEIA法や放射性元素で標識した抗体を用いるRIA法が一般的であるが、前者は試料の調整に手間と時間がかかり、後者は放射性元素の取り扱い施設を必要とする等の問題点を有していた。さらに別の方法として、抗体や抗原を金属電極の表面に固定化して、抗原・抗体反応に伴う表面電位変化を検出する試みもあるが、通常の金属薄膜電極を設けた場合、既に上述した様に、種々の検体液中での該金属薄膜表面と溶液との界面電位が一定とならず、電極表面での抗原抗体反応に伴う微少な電位変化を検出できないという問題点があった。

かかる状況に鑑みて本発明者らは、上記の様な欠点を有さないFETセンサを鋭意研究の結果、酸化イリジウム膜をゲート部に直接、又は導電体を介して設置する事により、上記の欠点が殆ど見

られないFETが得られる事、及び該酸化イリジウム膜上に抗体又は抗原物質膜を設ける事により、水溶液中の希薄な抗原物質や抗体を高感度良く、選択的に、かつ少量の検体量で検出できる事を見だし本発明に到達した。すなわち本発明は、抗体または抗原物質の薄膜を被覆した酸化イリジウム電極を作用電極とする免疫センサであり、又当該作用電極を参照電極と組合せ抗原物質または、抗体を含む溶液と接触させ、該作用電極上での抗原-抗体反応に伴う電位変化を、電位変化、電流変化或は電荷量変化として検出する事を特徴とする免疫検出方法である。

本発明の更に好ましい態様としては、

- (1) MOSFETのゲート金属として酸化イリジウムを用い、この上に抗体タンパクまたは、抗原物質の薄膜を設けて作用電極としたFET免疫センサ、
- (2) 抗体または抗原物質の薄膜を被覆した酸化イリジウム電極を、MOSFETのゲート領域以外に導電性配線を介して分離して設けたFET

免疫センサ

が挙げられる。

本発明に用いられる電極材料、又はゲート金属としての酸化イリジウム膜は、通常スパッタリングにより、膜厚500-1000Åになるように製膜される。該膜はその表面上に抗体や抗原物質の薄膜を固定化して、抗原・抗体反応に伴う膜電位変化を検出する電極として用いる事が出来る。別の態様として、上記の酸化イリジウム膜をMOSFETのゲート部に直接、又は導電体を介してゲート領域以外に設ける事も可能である。ここで言うMOSFETとは、p型又はn型シリコンウエハに逆符号の不純物をドーピングして(接合深さ5-10 μ)形成したソース電極及びドレイン電極、更にこれらの電極と電極の間の表面上にゲート部(ゲート長:10-100 μ 、ゲート巾:100-500 μ)を有するもので、かつゲート金属を取り除いたものであって、通常、500-1000Åの酸化シリコン層及びその上に形成された500-1000Åの窒化シリコン層から成る。前記酸化イリジウム膜を直接ゲ-

ト部に設置する場合は、高温下でスパッタリングにより製造する事が多いので、MOSFET基板を損傷する可能性があり、酸化タンタル等の中間層を設ける事が好ましい。また、酸化インリジウム膜をゲート領域以外に設ける場合は該膜の基板はガラスやプラスチック等の絶縁体やFETと同一のシリコン基板が好適に用いられ、金属導線や半導体導線を介してゲート部に接続される。分離ゲートをゲート部と接続する導線としては、異種金属との接合界面の形成を避ける為、酸化インリジウムを用いるのが好ましい。

次に、本発明に用いられる抗体や抗原物質は、免疫反応に関わるものであって分子内にイオン性基を有し、 $100\mu\text{V}$ 以上、好ましくは 1mV 以上の膜電位を示す 10G 、 10A 、 10E 、 10M 等の免疫グロブリンや絨毛性性腺刺激ホルモン(HCG)、ガン胎児性抗原(CEA)などが挙げられ、抗体としては、これらの抗原に対するポリクローナル又はモノクローナルな抗体が用いられる。

くは、 $0-2\text{V}$ の範囲で実験により決定される。

上記の抗原・抗体反応の検出は、電極表面上での電荷量変化、又は、ソース・ドレイン間の電流又は電圧変化を読み出す事により行われる。その際の電流又は電圧の変化量は検体液中の抗原又は抗体濃度に依存する。

抗原や抗体の濃度が希薄で、電流又は電圧の変化量が小さい場合には、バイポーラー型又は接合FET内蔵型の低雑音増幅器を併用し、デバイス周辺の電界シールドを行うことにより、抗原・抗体反応に伴う電気信号の検出が容易になる。

また、この抗原・抗体反応の検出に要する時間は、これらの濃度や電極表面の面積及び、抗体または抗原の固定量に依存するが、同一条件で比較した場合、後述の実施例4に示す様に、従来のEIA法やRIA法に比べ極めて迅速である。

本発明では更に、数種類の抗体又は/及び抗原を、個別の酸化インリジウム電極上に固定化したものを、同一の固体基板上に設置する事により、検体液中の複数の抗原又は/及び抗体を同時に検出

これらの抗原及び抗体分子は、単独で又は他の脂質分子と組み合わせて薄膜状、好ましくは単分子膜にした後、前記の酸化インリジウム電極上に固定される。該電極上への抗体及び抗原の固定化法としては、浸漬吸着法、流延法及びラングミュア・プロジェット法等が採用される。かくして、酸化インリジウム電極上に抗体又は抗原が固定された素子が、抗原又は抗体を含む被検体溶液に浸漬されると、該電極上での抗原-抗体反応に伴って、その表面膜電位が変化する。その結果、該膜電位変化量を直接、又は電流に変換して、低雑音増幅回路を通して検出する事により、抗原や抗体の検出が可能となる。

また、FETデバイスの場合には、ゲート電極上での抗原-抗体反応に伴ってソース・ドレイン間の電流又は電圧変化が誘起され、抗原や抗体の検出が可能となる。上記の抗原-抗体反応検出に際して採用されるドレイン電圧は、 $5-10\text{V}$ であり、ゲート電圧は上記の抗原・抗体の膜表面電位変化のしきい値により異なるが、 $0-5\text{V}$ 好まし

する事も可能である。

以上説明した本発明の免疫検出方法は、従来の方法に比べ簡便・迅速であり、また光や共存イオンの影響を殆ど受けず、これまでのFETセンサと比べても極めて安定である為、その開発の工業的意義は大である。以下、実施例を挙げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1

ガラス基板($1\text{cm} \times 1\text{cm}$)上にスパッタリング法により形成した酸化インリジウム薄膜($2\text{mm} \times 7\text{mm}$, 膜厚: 約 100\AA)電極上に、ラングミュア・プロジェット法を用いて、ヒト 10G をステアリン酸単分子膜と共に固定化した。上記方法で作成した2枚の 10G 固定化電極を用意し、一方の電極の抗原を紫外線照射により失活させ参照電極とし、増幅器(A)を介して、図1に示した回路構成で出力電圧の時間応答を測定した。上記電極が浸漬されたリン酸緩衝液 10mM に抗ヒト 10G 抗

体水溶液(10~100 μ l)を滴下すると、抗原・抗体反応によりI μ G固定化膜表面に電位が発生する。この電位は、酸化イリジウム電極と増幅器を含む低インピーダンス(1K Ω)回路に電流を流し、I-V(電流-電圧)コンバータ増幅器により出力される。この時、検出される電荷量、すなわち電流の時間積分量はリン酸緩衝液中に添加した抗体の量に比例する。図2に、検出された電荷量と抗体濃度との関係を示す。この測定回路系により、 1×10^{-7} モル/lの抗体が検出可能であった。

実施例2

図3、図4及び図5に、本実施例で用いたゲート分離型FETの構成を示す。まず、1cm \times 2cmのp型シリコンウエハにリンのn型不純物を拡散し、ソース電極(S')、ドレイン電極(D')を形成した後、ウエハ表面を酸化処理して、約2000ÅのSiO₂層を形成した。その後、ソース・ドレイン間の表面ゲート部(50 μ m巾 \times 1000 μ m長)、及び図3の分離ゲート電極部(2mm \times 7mm)に約800Åの膜厚の酸化イリジウム膜をスパッタリングにより設け、上記の表面ゲート部と分離ゲート電極部も酸化イリジウム薄膜で連結した。

かくしてシリコン基板上に製作した同一の免疫FET電極二本を用意し、それらの分離ゲート電極上に、それぞれ抗ヒトI μ Gを浸漬・吸着法により固定化した。その後、一方の電極上の抗体を紫外線照射により失活させ、参照電極とした後、リン酸緩衝液5ml中に上記の二本の分離ゲート電極を浸漬した。次いで、この緩衝液中に濃度不明のI μ Gの水溶液を滴下した後、抗原・抗体反応に伴うゲート電極表面上の膜電位変化を測定した。

この測定に際しては、ゲート電圧は白金電極により一定(0~2V)となる様に設定し、ドレイン電圧としては5V印加した処、I μ G溶液滴下30秒後に、ドレイン電圧の変化は2mVと定常値になり、予め作成しておいた検量線より求めたI μ G濃度は、 2×10^{-4} モル/lであった。

実施例3

実施例2に於て、酸化イリジウム薄膜より成るゲート部をFET本体から分離せずに直接、ソース・ドレイン間表面上設け、その表面上に抗ヒトI μ G抗体を同様に固定化して、実施例2と同様にして抗原・抗体反応を行った。検体液滴下後のドレイン電圧の変化量は、30秒後に約70mVと一定になり、検量線より求めたI μ G濃度は、 2.8×10^{-4} モル/lであった。上記抗体液中に新たな電解質として塩化カリウムを0.1~0.5wt%になる様に添加し、同様に抗原・抗体反応を行ったが、ドレイン電圧の変化量は、上記の場合と同様、30秒後に約70mVと再現性の良い結果が得られた。また、本実施例に於ける、抗原・抗体反応の検出に当たって、外部光の影響は全く認められなかった。

実施例4

本実施例は、EIA法に比べて本発明のFETデバイスを用いれば、抗原・抗体反応の検出が極

めて迅速に行える事を示す。

実施例1で用いた、酸化イリジウム電極表面に 3×10^{-7} モルの抗ヒトI μ G抗体をステアリン酸バリウムと共に、ラングミュア・ブロッジェット法により固定したものを2枚用意し、内1枚は、実施例1と同様の電荷量測定回路に組み込んだ処、 10^{-7} モル/lのヒトI μ Gが30~40秒で検出できた。一方、もう一枚の抗ヒトI μ G固定サンプルを用い、上記と同一濃度のヒトI μ G水溶液に浸漬後、その表面にペルオキシターゼ標識抗ヒトI μ G抗体を更に反応させ、しかる後、過酸化水素水とo-フェニレンジアミンを系に加えEIAを行った処、 10^{-7} モル/lのヒトI μ Gの検出に合計160分を要した。

比較例1

本例は、ゲート金属として、酸化イリジウム以外の金属を用いた場合に、抗原抗体反応に伴う電位変化が検出できない事を示す。

ゲート金属として酸化イリジウムの代わりに、

700Åの厚みのアルミニウム薄膜を用いて実施例3と同様にして抗ヒトIgG抗体を固定化した後、実施例2と同様にして抗原・抗体反応を行った。検体液滴下後のドレイン電圧の変化量は、検体液中の電解質濃度によって変わり実質的には、抗原抗体反応の検出は不可能であった。

比較例2

本例は、ゲート金属を取り除いた通常のMOSFETを用いて、抗原抗体反応を行った場合の、外部光の影響について示す。

実施例2に於て、ゲート金属を用いずゲート絶縁膜上に抗体を直接固定し、同様に抗原・抗体反応を350ルクスの外部光照射下で行った処、ドレイン電圧の変化は3-5mVの間で一定せず、また外部光のオン・オフにより変動した。

4. 図面の簡単な説明

図1は抗原固定電極の構成と測定回路を表わす。

図中、IgGは免疫グロブリンGを、Ref.は参照電極を、Rは抵抗、Aは増幅器、Vは電圧計

を表す。また、CはFETのゲート部と分離ゲートとを連結する酸化シリコンから成る導線を意味する。

を表わす。また、Shieldは、電界や磁界による電気信号ノイズに対する遮蔽器具を意味する。

図2は抗IgG濃度と検出電荷量の関係を表わす。

図中、Qは検出電荷量を、抗IgGとは抗原物質であるヒトIgGに対する抗体を意味する。

図3は免疫FET(平面図)を表わす。

図中、SとS'はそれぞれFETのソースとソース電極を、DとD'はドレインとドレイン電極を表し、Gは分離ゲートを表す。また、CはFETのゲート部と分離ゲートとを連結する酸化シリコンから成る導線を意味する。更に、A-A'とB-B'は各々、本発明のFETの長手方向及び横方向の断面を表す。

図4は免疫FET(A-A'断面図)を表わす。

図中、Cは酸化シリコンを表し、Eはエポキシ樹脂を表す。

図5は免疫FET(B-B'断面図)を表わす。

図中、SとS'はそれぞれFETのソースとソース電極を、DとD'はドレインとドレイン電極

特許出願人 帝人株式会社
代理人 井理士 前田 純 岡

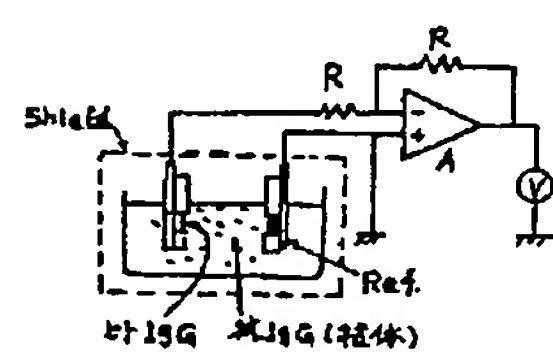


図1 抗原固定電極の構成と測定回路

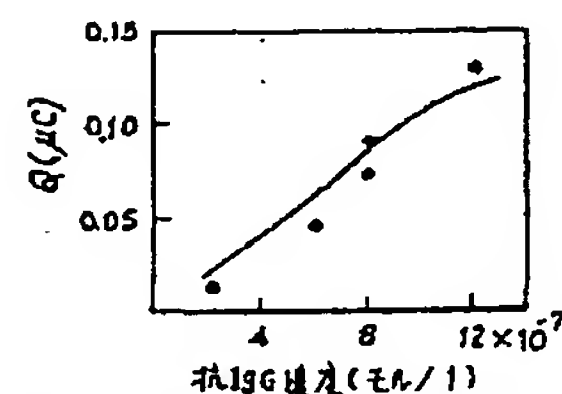


図2. 抗IgG濃度と検出電荷量

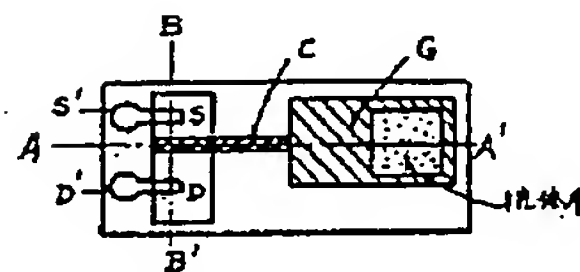


図3 免疫FET(平面図)

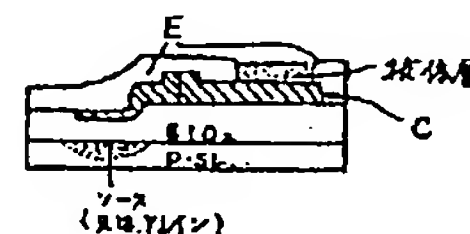


図4 免疫FET(A-A'断面図)

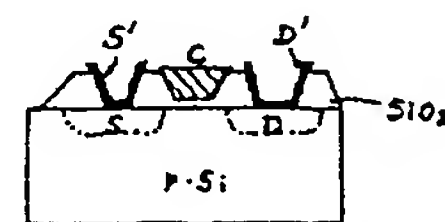


図5 免疫FET(B-B'断面図)